

УДК 602.4:576.3:582

DOI: 10.31073/onehealthjournal2024-I-03

**ОПТИМІЗАЦІЯ ОКРЕМИХ ПАРАМЕТРІВ МТТ-ТЕСТУ ДЛЯ ОЦІНКИ
МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН ВНК-21 ТА НВ-2**

Кляп Н. І.¹ (ORCID ID 0000-0002-2271-0682), Болотін В. І.¹ (ORCID ID 0000-0001-9875-6639), Мазуркевич Т. А.² (ORCID ID 0000-0002-1294-5939)

¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ;

²Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ.
e-mail: nzoltan@ukr.net

Резюме. Мета роботи полягала у визначенні залежності кількості формазану від часу інкубації перещеплюваних культур клітин при проведенні ММТ-тесту. Перещеплювані культури клітин нирки сирійського хом'яка (ВНК-21) і нирки віви (НВ-2) культивували у поживному середовищі DMEM з додаванням 10 % ембріональної сироватки теляти (FBS), антибіотики Pen Strep (Gibco) та Amphotericin B (Gibco) у 96-лункових планшетах в концентраціях 35×10^3 і 25×10^3 клітин/лунку в 100 мкл при 5 % CO₂ за температури 37 °C впродовж 24 год. Після цього в кожен лунку вносили по 100 мкл розчину МТТ у концентрації 0,5 мг/мл та інкубували впродовж 3 або 4 год. У подальшому видаляли супернатант та додавали до кожної лунки по 100 мкл ДМСО та визначали оптичну густину вмісту лунок через 10, 20 та 30 хв інкубації клітин за довжини хвилі 595 нм. Було встановлено пряму залежність кількості утвореного формазану від терміну інкубації клітин НВ-2 і ВНК-21 з реактивом МТТ-тетразолієвої солі. Порівняльний аналіз відповідних значень оптичної густини (ОГ) між клітинними лініями НВ-2 і ВНК-21 вказує на прямолінійну залежність кількості утвореного формазану не лише від концентрації посіву, а й від виду культивованих клітин. Так, за умов внесення у 96-лункові планшети клітинної суспензії НВ-2 у концентрації 35×10^3 клітин/лунку в 100 мкл поживного середовища, через 24 год культивування та 4 год інкубації клітин з реактивом МТТ (загалом 28 год після посіву), встановлено вищі значення ОГ порівняно з відповідними значеннями клітин ВНК-21, що були висаджені у вищій концентрації (40×10^3 клітин/лунку в 100 мкл поживного середовища). Порівняльний аналіз отриманих значень ОГ за умов дії ДМСО на кристали формазану впродовж 10, 20 і 30 хв вказував на відсутність суттєвої різниці. При плануванні експериментів, в основу яких покладено дослідження метаболічної активності та життєздатності клітин НВ-2 і ВНК-21, МТТ-тест слід проводити, керуючись визначеними параметрами, що дозволить уникнути отримання хибних результатів та формування упереджених висновків під час проведення подальших експериментальних досліджень *in vitro*.

Ключові слова: МТТ-тест, метаболічна активність клітин, НВ-2, ВНК-21

Реагент МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразолію бромід) – монотетразолієва сіль, яка має властивість проникати крізь клітинну і внутрішню мітохондріальну мембрани та в подальшому метаболічно активними клітинами відновлюється до формазану (Berridge et al., 2005). Хромогенна природа цієї окисно-відновної хімічної реакції забезпечує колориметричне вимірювання внутрішньоклітинно утвореного формазану, на основі якого у 1983 році Mosmann et al. розробили дослідження МТТ (Mosmann et al., 1983). Фотометрія оптичної густини (ОГ) проводиться на довжині хвилі, яку розчин МТТ-формазану поглинає найбільше (близько 570 нм)

(Ghasemi et al., 2021). Вважається, що виміряні значення ОГ відображають концентрацію утвореного клітинами формазану, а відповідно і внутрішньоклітинне зниження вмісту реагенту МТТ. Впродовж чотирьох десятиліть це стало основою для застосування аналізу МТТ як загального інструменту для визначення метаболічної активності, клітинної проліферації, життєздатності клітин і цитотоксичності ліків (Stockert et al., 2018; Rai Y. et al., 2018; Carreno E. et al., 2021).

Однак цей метод дослідження не варто відразу застосовувати для визначення життєздатності клітин. Слід провести необхідні випробування з метою оптимізації процедури виконання МТТ-дослідження на визначених для експерименту клітинних лініях з подальшою раціональною інтерпретацією отриманих результатів. Потрібно враховувати, що результати дослідження прямо залежать від концентрації, виду, а відповідно і особливостей метаболізму клітин, що в свою чергу також залежить від багатьох факторів. Слід зазначити, що на рівень ОГ також суттєво впливає кількість реагенту МТТ, який потрапляє в клітину (Nga NTH et al., 2020; Ghasemi et al., 2021; Smail et al., 2021). Згідно літературних даних, до цього часу окремі параметри протоколу виконання даного колориметричного дослідження залишаються не визначеними. Зокрема, термін інкубації клітин з реагентом МТТ становить 2 (Mansoury et al., 2021), 3 (Marchenko et al., 2008; Lisianyi et al., 2010) або 4 год (Babacan et al., 2011; Sylvester et al., 2022), а час необхідний для розчинення кристалів формазану у ДМСО (диметилсульфоксид) варіює від 10 (Ghasemi et al., 2021) до 30 хв (Marchenko et al., 2008; Babacan et al., 2022) відповідно.

З огляду на це, виникає необхідність виконання досліджень з метою визначення чітких параметрів проведення процедури випробування МТТ-тесту. Його оптимізація та раціональна інтерпретація даних необхідні для запобігання отримання недостовірних результатів та формування хибних висновків щодо життєздатності клітин чи цитотоксичної активності досліджуваних речовин.

Мета роботи. Визначення залежності кількості утвореного формазану від часу інкубації клітин ВНК-21 і нирки вівці (НВ-2) з реагентом МТТ-тетразолієвої солі та встановлення терміну часу необхідного для розчинення утворених кристалів формазану в органічному розчиннику ДМСО.

Матеріали і методи досліджень. Перещеплювані клітини НВ-2 (клітини нирки вівці) та ВНК-21 (клітини нирки сирійського хом'яка) культивували в поживному середовищі DMEM (середовище Ігла модифіковане Дюльбеко) (Gibco), що містить 10 % ембріональної сироватки теляти (FBS), антибіотика Pen Strep (Gibco) та Amphotericin B (Gibco) у вологому середовищі 5 % CO₂ при 37 °C на пластиковому посуді (Fisher Scientific). Пересів клітин здійснювали за допомогою 0,25 % Trypsin-EDTA (Gibco) при утворенні суцільного клітинного моношару. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 CFL (Німеччина).

Керуючись результатами попередньо проведених нами досліджень, суспензії клітин ВНК-21 і НВ-2 вносили до 96-лункових планшетів (по 6 кожного виду клітин) в концентраціях 35×10^3 і 25×10^3 клітин/лунку в 100 мкл поживного середовища відповідно та культивували впродовж 24 год за стандартних умов. Контролем слугували лунки без клітин з поживним середовищем.

З метою визначення залежності кількості утвореного формазану від терміну інкубації клітин ВНК-21 і НВ-2 з реагентом МТТ-тетразолієвої солі в кожен лунку 96-лункових планшетів вносили по 100 мкл розчину МТТ (Invitrogen, США) у концентрації 0,5 мг/мл (Ghasemi et al., 2021) та інкубували у вологій атмосфері при 37 °C впродовж 3 (n = 3 планшети) та 4 (n = 3 планшети) год. Надалі видаляли супернатант та додавали до кожної лунки по 100 мкл ДМСО. Оптичну густину вмісту лунок визначали через 10, 20 та 30 хв інкубації клітин з ДМСО при довжині хвилі 595 нм за допомогою фотометру BIO-RAD iMark (США).

Результати дослідження. Знання особливостей росту культури клітин є ключовим елементом з визначення оптимального часу для пасажування, концентрації клітинної суспензії та оцінки ефективності посіву за різних щільностей клітинного моношару. Відповідно, для планування подальших експериментів з обраними культурами клітин перш за все визначали оптимальні концентрації клітинних суспензій HB-2 і ВНК-21 для посіву на 96-лункові планшети з метою отримання через 24 год інкубації моношару конфлюентністю 75-80 % (логарифмічна фаза росту клітин). Слід зауважити, що визначення впливу потенційних досліджуваних речовин на метаболізм проліферуючих клітин доцільно проводити саме в логарифмічній фазі росту клітинної популяції (у випадку використання генетично однотипної клітинної лінії), коли більшість клітин синхронно входять у фази циклу (Nga NTH et al., 2020). Водночас, при визначених щільностях посіву відмічається подальша проліферація та життєдіяльність клітин без ознак старіння впродовж наступних 48-72 год культивування, встановлених для інкубації клітин з експериментальними речовинами (рис. 1, 2). Слід враховувати, що надмірна щільність росту клітин призводить до уповільнення метаболічної активності, а відповідно формування хибних висновків щодо підвищеної цитотоксичності досліджуваних речовин.

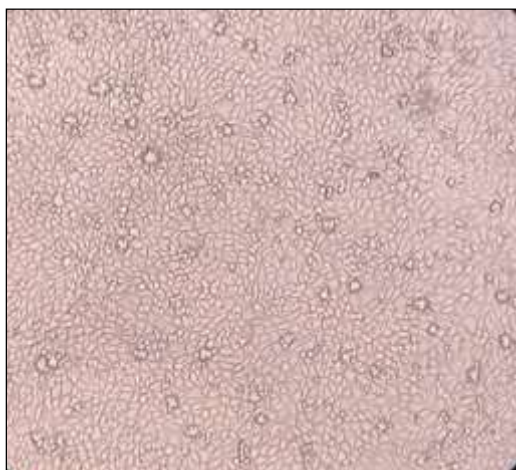


Рисунок 1. Моношар клітин HB-2 через 72 год культивування (25×10^3 клітин/лунку в 100 мкл поживного середовища)



Рисунок 2. Моношар клітин ВНК-21 через 72 год культивування (35×10^3 клітин/лунку в 100 мкл поживного середовища)

На наступному етапі досліджень проводили культивування клітин з реактивом МТТ впродовж 3 і 4 год, та подальший порівняльний аналіз отриманих даних, що дало можливість встановити пряму залежність кількості утвореного формагану від терміну інкубації клітин ВНК-21 і HB-2 з реактивом МТТ-тетразолієвої солі. Так, середні значення ОГ вмісту лунок через 4 год інкубації клітин HB-2 з МТТ-реагентом (0,5 мг/мл) становили 1,59, 1,57, 1,56 (за умов дії розчинника ДМСО впродовж 10, 20, 30 хв), що на 0,38, 0,36 та 0,30 більше (24, 23 і 19 % відповідно), порівняно з середніми значеннями ОГ за умов інкубації даних клітин впродовж 3 год (рис. 3).

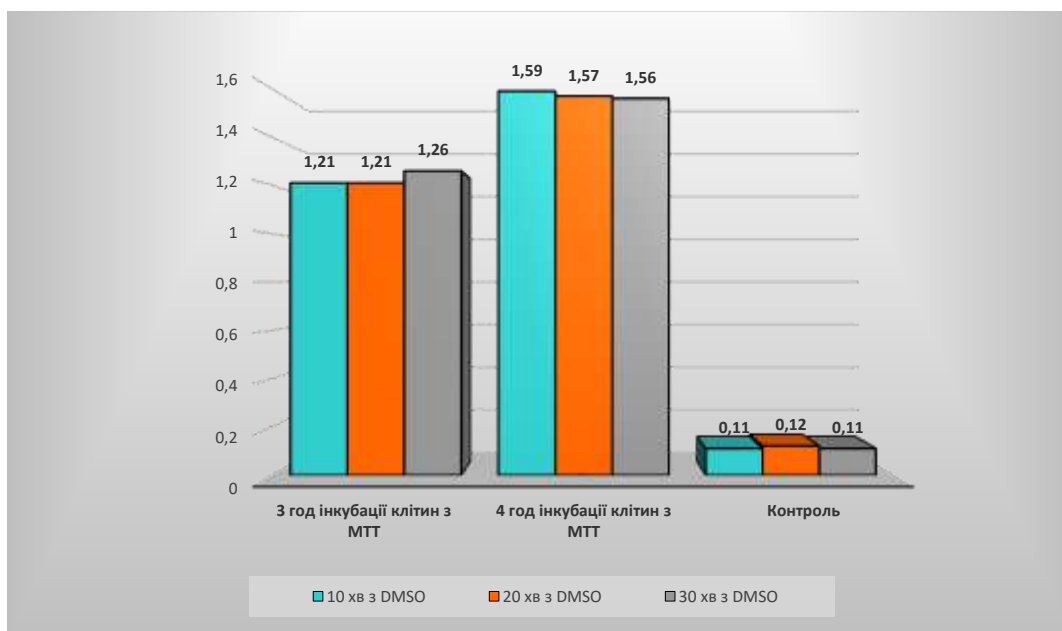


Рисунок 3. Порівняння середніх значень ОГ вмісту лунок за умов інкубації клітин НВ-2 з МТТ-реагентом впродовж 3 та 4 год (дія розчинника ДМСО – 10, 20, 30 хв.)

Водночас, середні значення ОГ через 4 год інкубації клітин ВНК-21 з реактивом МТТ становили 1,41; 1,44 і 1,42, що на 0,12; 0,16 і 0,11 більше (9; 11 і 8 % відповідно), порівняно зі значеннями ОГ вмісту лунок за умов інкубації клітин з МТТ впродовж 3 год (рис. 4). За відсутності в лунках клітин (контроль), рівні ОГ були подібними за різних термінів інкубації і варіювали в межах 0,11 – 0,12.

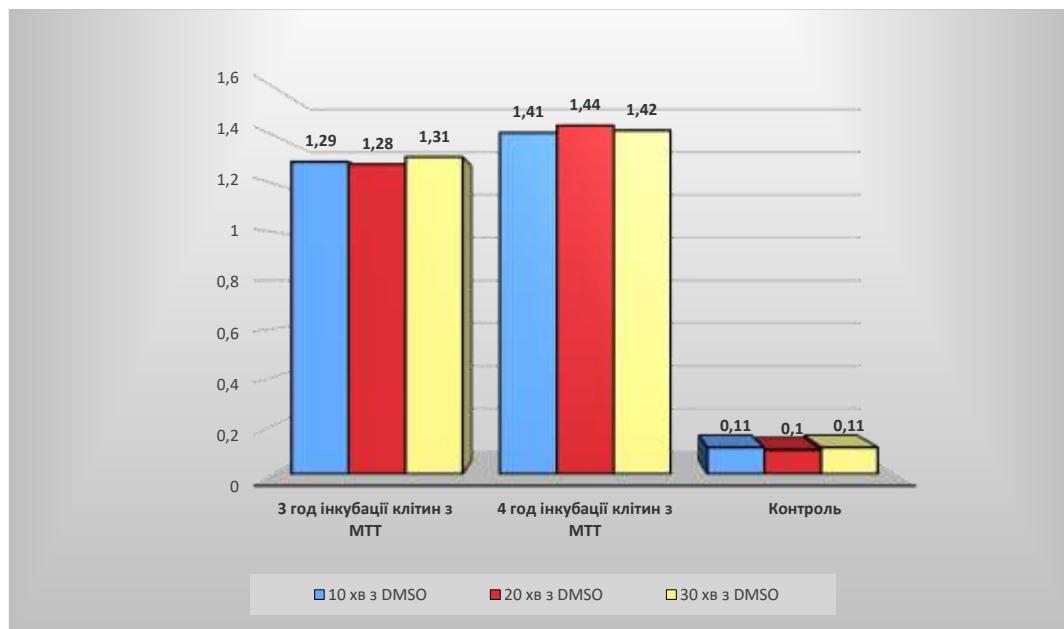


Рисунок 4. Порівняння середніх значень ОГ вмісту лунок за умов інкубації клітин ВНК-21 з МТТ-реагентом впродовж 3 та 4 год (дія розчинника ДМСО – 10, 20, 30 хв.)

Слід зауважити, що порівняння відповідних значень ОГ між клітинними лініями НВ-2 і ВНК-21 вказує на безпосередню залежність кількості утвореного формазану не лише від кількості посіву, а й від виду культивованих клітин, і, відповідно, особливостей їх проліферації та метаболізму. Так, за умов посіву на 96-лункові планшети клітинної

суспензії НВ-2 у концентрації 25×10^3 клітин/лунку в 100 мкл поживного середовища через 24 год культивування та 4 год інкубації клітин з реактивом МТТ (загалом 28 год після посіву), встановлено вищі значення ОГ порівняно з відповідними значеннями клітин ВНК-21, що були посіяні у вищій концентрації (35×10^3 клітин/лунку в 100 мкл поживного середовища).

Одним із завдань проведення експерименту було встановлення часу, необхідного для розчинення утворених кристалів формазау в органічному розчиннику ДМСО. Згідно отриманих результатів, порівняльні дослідження значень ОГ за умов дії ДМСО впродовж 10, 20 і 30 хв суттєво не різнилися. Так, значення ОГ вмісту лунок за умов інкубації клітин НВ-2 з МТТ-реагентом впродовж 3 год становили 1,21; 1,21 та 1,26; 4 год – 1,59; 1,57 і 1,56. Таку ж закономірність було встановлено при визначенні метаболічної активності клітин ВНК-21: відповідні значення становили 1,29; 1,28; 1,31 та 1,41; 1,44 і 1,42 відповідно.

Обговорення. Аналіз результатів досліджень свідчить про те, що збільшення часу інкубації клітин НВ-2 і ВНК-21 з реактивом МТТ призводить до підвищення значень ОГ, що, напевно, характеризує зниження внутрішньоклітинного вмісту МТТ та збільшення кількості утвореного формазау, незалежно від виду і концентрації клітинних суспензій, використаних для посіву на 96-лункові планшети. Водночас, результати досліджень Ghasemi et al. (Ghasemi et al., 2021) на клітинній лінії PC-3 із застосуванням діапазону концентрацій МТТ (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 і 0,5 мг/мл) свідчать, що збільшення концентрації МТТ до 0,4 мг/мл призводить до збільшення рівнів ОГ, незалежно від кількості клітин і моменту часу вимірювання. Однак підвищення концентрації МТТ з 0,4 до 0,5 мг/мл не призводило до подальшого підвищення рівнів ОГ, незалежно від кількості клітин і моменту вимірювання. Тобто, концентрація МТТ, при якій утворюється максимальний рівень формазау перед спричиненою МТТ загибеллю клітин, повинна бути обрана як оптимальна концентрація МТТ для кожного конкретного типу клітин, кількості клітин і часу інкубації.

Також слід враховувати, що за умов проведення експериментальних досліджень з цитотоксичності певних розчинів та лікарських засобів, структура, метаболічна активність і реакція клітин на підвищену концентрацію МТТ також може змінюватися. Тому, при виборі оптимальної концентрації і терміну інкубації з реактивом МТТ для проведення порівняльного аналізу між різними методами лікування рівні ОГ необхідно вимірювати за всіх умов.

Крім того, отримані результати досліджень підтверджують, що рівень ОГ не завжди прямо залежить від кількості висіяних клітин, оскільки адгезивні властивості, проліферативна активність та метаболізм кожного типу клітин суттєво відрізняються, що також необхідно враховувати при плануванні досліджень з використанням МТТ-тесту. Згідно наукових досліджень, проведених рядом вчених (Ward et al., 2012; Rai et al., 2018; Carreño et al., 2021), підвищення ОГ може бути результатом збільшення щільності, а не лише кількості клітин як такої, враховуючи, що просторова близькість клітин одна до одної може впливати на міжклітинні зв'язки, а отже, змінювати метаболічну поведінку клітин. Тобто, рівень утвореного клітинами формазау підвищується не лише у випадку збільшення кількості клітин. Зростання щільності клітин також може впливати на рівень виробленого формазау в кожній окремій клітині через зміну природи міжклітинних зв'язків та, як наслідок, підвищення ферментативної активності клітин.

Таким чином, отримані результати проведених досліджень узгоджуються з даними інших науковців щодо необхідності визначення чітких параметрів виконання МТТ-дослідження на обраних клітинних лініях. Нехтування оптимізацією випробувань може призвести до отримання хибних результатів та формування упереджених висновків під час проведення подальших експериментальних досліджень *in vitro*.

Висновки.

1. За умов дослідження метаболічної активності та життєздатності клітин за допомогою застосування МТТ-аналізу, значення ОГ відображають сукупність дії багатьох факторів як на рівні однієї клітини, так і всієї клітинної популяції: вид, концентрація посіву, фаза росту клітин, швидкість поглинання МТТ і утворення кристалів формазану, на які водночас потенційно можуть впливати речовини, що експериментально випробовуються *in vitro*.

2. Оптимальні параметри проведення МТТ-тесту на клітинних лініях нирки вівці (НВ-2) та нирки сирійського хом'яка (ВНК-21): щільність посіву клітин НВ-2 і ВНК-21 на 96-лункові планшети – 25×10^3 і 35×10^3 клітин/лунку в 100 мкл поживного середовища; рекомендовано інкубувати клітини з реактивом МТТ-тетразолієвої солі впродовж 4 год (концентрація 0,5 мг/мл) та після подальшого видалення супернатанту – інкубація 10-15 хв в ДМСО; ОГ вмісту лунок визначати при довжині хвилі 595 нм.

REFERENCES

1. Marchenko, M.L., Bezdenieznykh, N.O. & Kudriavets, Yu.I. (2008). Porivnialna kharakterystyka tsytotoksychnoho vplyvu spoluk vazhkykh metaliv na klityny liudyny, kultyvovani in vitro. *Ukrainskyi zhurnal z problem medytsyny pratsi*; 3(15):27–34. [in Ukrainian].
2. Lisianyi, M.I. & Liubych, L.D. (2010). Metodyka doslidzhennia tsytotoksychnoi aktyvnosti imunokompetentnykh klityn MTT-kolorymetrychnym metodom. *Imunolohiia ta alerholohiia: nauka i praktyka*; 3(4):54–59. [in Ukrainian].
3. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, *Biotechnol. Annu. Rev.*; 11:127–152. doi:10.1016/s1387-2656(05)11004-7.
4. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*; 65:55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
5. Stockert J.C., Horobin R.W., Colombo L.L., Blázquez-Castro A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.*; 120:159–167. doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.005.
6. Ümit Babacan, Adem Kaba, Fatma Akçakale, Ersin Akinc, Mehmet Fatih Cengiz (2022). Optimization of some parametric values of MTT for the determination of human melanoma (SK-Mel-30) cell viability. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*; 5(1):9-20. doi:10.38001/ijlsb.991615.
7. Mahshid Ghasemi, Tyron Turnbull, Sonia Sebastian, and Ivan Kempson. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.*; 22(23):12827. doi: 10.3390/ijms222312827.
8. Morva Mansoury, Maya Hamed, Rashid Karmustaji, Fatima Al Hannan, Stephen T. Safrany (2021). The edge effect: A global problem. The trouble with culturing cells in 96-well plates, *Biochemistry and Biophysics Reports.*; 26. doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100987.
9. Sylvester, P. W. (2011). Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. *Drug Design and Discovery*; 157–168. doi:10.1007/978-1-61779-012-6_9.
10. Ward P.S., Thompson C.B. (2012). Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*; 4. doi: 10.1101/cshperspect.a006783.
11. Rai Y., Pathak R., Kumari N., Sah D.K., Pandey S., Kalra N., Soni R., Dwarakanath B.S., Bhatt A.N. (2018). Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci.Rep.*; 8:1–15. doi: 10.1038/s41598-018-19930-w.

12. Smail N., Ab Ghani N.B., Rusli S.N.A., Abdullah N.A., Awang R.A. (2021). Cytotoxicity assessment of zirconia-reinforced experimental nanohybrid dental composite using MTT assay. *Ann. Rom. Soc. Cell Biol.*; 25(4):14878–14886.
13. Carreno E., Alberto A., de Souza C., de Mello H., Henriques-Pons A., Alves L.A. (2021). Considerations and Technical Pitfalls in the Employment of the MTT Assay to Evaluate Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Appl. Sci.*; 11(6):2603. doi: 10.3390/app11062603.
14. Nga NTH, Ngoc TTB, Trinh NTM, Thuoc TL, Thao DTP. (2020). Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Anal Biochem.*; 610:113937. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113937>.

OPTIMIZATION OF SEVERAL MTT ASSAY PARAMETERS TO EVALUATE THE METABOLIC ACTIVITY OF THE BHK-21 AND SHEEP KIDNEY CELLS

Klyap N. I.¹ (ORCID ID 0000-0002-2271-0682), Bolotin V. I.¹ (ORCID ID 0000-0001-9875-6639), Mazurkevych T. A.² (ORCID ID 0000-0002-1294-5939)

¹State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv,

² National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv.
e-mail: nzoltan@ukr.net

Abstract. *The purpose of the work was to define the effect of the amount of formazan on the incubation time of transplanted cell cultures in the MTT assay. Transplanted cultures of Syrian hamster kidney (BHK-21) and sheep kidney (NV-2) cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FBS), Pen Strep antibiotic (Gibco), and Amphotericin B (Gibco) in 96-well tablets in concentrations of 35×10^3 and 25×10^3 cells/well in 100 μ l at 5% CO₂ at a temperature of 37 °C for 24 hours. After that, 100 μ l of MTT solution at a concentration of 0.5 mg/ml was added to each well and incubated for 3 or 4 hours. Subsequently, the supernatant was removed and 100 μ l of DMSO was added to each well, and the optical density of the contents of the wells was determined after 10, 20, and 30 min of cell incubation at a wavelength of 595 nm. A direct dependence of the amount of formazan formed on the incubation period of NV-2 and BHK-21 cells with the MTT-tetrazolium salt reagent was established. A comparative analysis of the corresponding optical density (OD) values between HB-2 and BHK-21 cell lines indicates a linear dependence of the amount of formazan formed not only on the seeding concentration, but also on the type of cultured cells. Thus, under the conditions of introduction of NV-2 cell suspension at a concentration of 35×10^3 cells/well in 100 μ l of nutrient medium into 96-well plates, after 24 h of cultivation and 4 h of incubation of cells with the MTT reagent (in total, 28 h after seeding), it was established higher OG values compared to the corresponding values of VNK-21 cells that were planted at a higher concentration (40×10^3 cells/well in 100 μ l of nutrient medium). A comparative analysis of the obtained OG values under the conditions of DMSO action on formazan crystals for 10, 20 and 30 min indicated the absence of a significant difference. When planning experiments based on the study of the metabolic activity and viability of NV-2 and BHK-21 cells, the MTT assay should be performed guided by the specified parameters, which will avoid obtaining false results and forming biased conclusions during further experimental in vitro studies.*

Keywords: MTT assay, metabolic activity of cells, BHK-21

DOI: 10.31073/onehealthjournal2024-I-03